

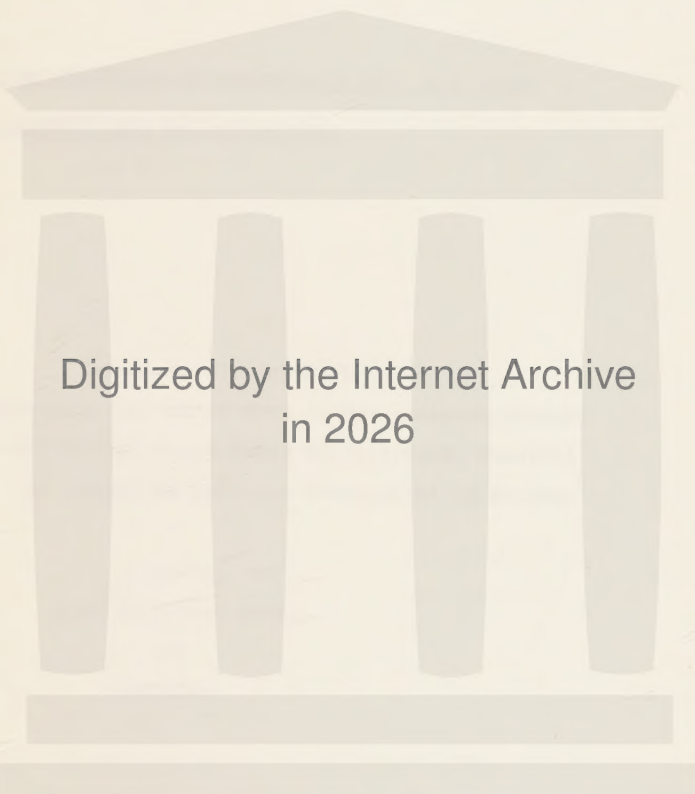
THESIS

MUNICH

1969

**Tierexperimentelle Untersuchungen
über die orale Immunisierung
mit Vaccinia-Virus**

HANS CHRISTOPH  HUBER



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus der Bayerischen Landesimpfanstalt München

Direktor: Prof.Dr. H.Stickl

Tierexperimentelle Untersuchungen über die orale
Immunisierung mit Vaccinia-Virus

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Hans Christoph Huber
aus
München

München 1969

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität
München

Berichterstatter: Prof.Dr. H.Stickl

Mitberichterstatter: Prof. Dr. H. Eyer

Dekan: Prof.Dr. F.Marguth

Tag der mündlichen Prüfung: 25.2.1969

Tierexperimentelle Untersuchungen

über die orale Immunisierung

mit Vaccinia-Virus

Disposition:

I) Einleitung

Allgemeines über die Immunisierung per os.

Zielsetzung der vorliegenden Arbeit.

II) Material und Methoden

- Virus
- Versuchstiere
- Virusnachweis
- Antikörpernachweis
- Nachweis der Gewebeimmunität
- Verlauf der cutanen Nachimpfung

III) Durchführung und Ergebnisse der Versuche

- 1) Resorption des Virus aus dem Verdauungstrakt
(Resorptionsviraemie)
- 2) Der Nachweis des Virus an der Resorptionsstelle und
im Blut 24 und mehr Stunden nach Applikation als
Ausdruck der Infektionsviraemie
- 3) Stimulation der Immunogenese
 - a) durch aktives Virus
 - b) durch inaktiviertes Virus
- 4) Die Unschädlichkeit der oralen Immunisierung

IV) Diskussion

V) Zusammenfassung

VI) Schrifttum

I) Einleitung

Die Vorteile einer oralen Immunisierung sind durch bereits eingeführte Verfahren in Human- und Tiermedizin bekannt. Sie kann ohne erheblichen Aufwand vorgenommen werden. Sie bedarf keiner besonders geschulten Hilfskräfte und keines komplizierten Instrumentariums. Es bestehen keine Gefahren durch unzureichende Sterilisation der Instrumente.

Bereits 1891 zeigte EHRLICH durch Fütterung von Ricin und Abrin an Mäusen die Möglichkeit einer aktiven Immunisierung per os. 1892 gelang ihm auch eine passive Immunität durch stomachale Einverleibung von Antitoxinen zu erzielen. Nachdem man endgültig zur Ansicht gekommen war, daß Bakterien die unverletzte Schleimhaut des Darmes passieren können (FICKER), folgten viele Tierexperimente, welche die Möglichkeit einer oralen Immunisierung mit lebenden oder abgetöteten Bakterien aufzeigten. Zum Beispiel konnte CHVOSTEK 1908 durch Verfütterung von Dysenterie- Bakterien Immunität hervorrufen. Diese und ähnliche Ergebnisse erfuhren in neuester Zeit hauptsächlich durch RAETTIG ihre Bestätigung.

Es zeigte sich aber auch, daß eine Immunität gegen Virusinfekte durch Virusverfütterung erreicht werden kann. 1953 konnten KOPROWSKI, HERVIS, NORTON und NELSON nach oraler Applikation eines

attenuierten Poliomyelitis-Virus bei Menschen und Affen Antikörperbildung zu induzieren.

In der vorliegenden Arbeit wird versucht, eine Immunisierung gegen Pocken durch orale Gabe von Vaccinia-Virus-Präparaten zu erreichen. Die prinzipielle Möglichkeit wurde zwar von HERRLICH bejaht, doch sind die experimentellen Untersuchungen darüber noch recht spärlich und nur bei älteren Autoren (CASAGRANDE, ANTOINE und WAGEMANS) zu finden. Die vorliegenden Untersuchungen sollen die folgenden Fragen klären:

- 1) Tritt das Vaccinia-Virus aus dem Verdauungstrakt direkt ins Blut über?
- 2) Wie lange ist das Virus im tractus digestorius und im Blut nachweisbar?
- 3) Stimuliert das resorbierte Virus die Immunogenese?
- 4) Ergeben sich Anhaltspunkte dafür, daß die orale Immunisierung gegen Pocken den bisher gebräuchlichen Immunisierungsmethoden hinsichtlich Verträglichkeit und Unschädlichkeit überlegen ist?

II) Material und Methoden

Vaccinia-Virus: Wenn nicht anders angegeben, wurde für die Versuche der Dermoimpfstoff vom Rind, Stamm Bern (Titer 1×10^8 VE/ml, Suspensionsmittel 60 % Glycerin, 40 % physiologische Kochsalzlösung), verwandt. Inaktiviertes Virus war formalinisiertes Gewebekulturvirus, das handelsübliche Vaccinia-Antigen, oder Dermovirus vom Rind, das durch Erhitzen auf 65° für 1 Stunde inaktiviert worden war.

Als Versuchstiere dienten Ektromelie-freie, konventionell gehaltene Mäuse vom Stamm NMRI, 2 - 3 kg schwere Inzucht-Albinokaninchen und Meerschweinchen aus institutseigener Zucht, die vor den Versuchen keine hämagglutinationshemmende (HAH-) Antikörper gegen Vaccinia-Virus besaßen.

Der Virusnachweis wurde auf der gesenkten Chorionallantois-membran 11 Tage bebrüteter Hühnereier ausgeführt. Die verimpfte Menge war jeweils 0,2 ml. Die Eier wurden 3 Tage weiterbebrütet. Zu einer 2. Passage wurden die gesenkten Membranen ausgeschnitten, eingefroren, im Mörser verrieben und 1 : 5 in 0,9 % gepufferter NaCl suspendiert.

Zum Antikörpernachweis diente die Haemagglutinations-hemmungsreaktion in Anlehnung der Methode nach SALK bzw. in der Modifikation von HIRST und MAYR. Die Hühner-erythrocytensuspension war 0,5 %-ig, ausgehend vom gewaschenen und gepackten Sediment. Die Antigensuspension enthielt 4 hämagglutinierende Einheiten Vaccinia-Virus.

Die Serumverdünnung wurde beginnend mit 1:4 in negativen 2-er Potenzen fortgeführt. Der Titer des Serums entspricht der Verdünnung, in der die Agglutination noch einwandfrei gehemmt wird.

Zum Nachweis einer vaccinia-spezifischen Gewebeimmunität wurde die in diesem Zusammenhang erstmals von STICKL und ENGELHARDT beschriebene Leukocytolysereaktion angesetzt. Heparinisiertes Vollblut (500 IE Heparin/ml) wird in U-förmig gebogene Kapillarröhrchen mit 1-2 mm Durchmesser gefüllt. Die offenen Enden der Röhrchen werden mit Paraffin verschlossen, diese 5 Minuten lang bei ca. 230 g (300 UpM) zentrifugiert. Danach werden die Kapillaren an der Grenze der Erythrocyten- zur Leukocyten-schicht durchgesägt. Das Leukocyten- Plasmagemisch aus beiden Schenkeln der U-Röhrchen wird in Hohlschliff- Objektträger mit 2 Vertiefungen eingebracht, und zwar im Versuchsansatz 0,1 ml Leukocyten-suspension + 0,05 Gewebekulturvirus-suspension (Titer 5×10^8 VE), im Kontrollansatz 0,1 ml Leukocyten-suspension + 0,05 ml 0,9 % NaCl. Außerdem wurden jeweils noch Leukocyten-suspensionen nicht vaccine-immuner Tiere zum Vergleich mit angesetzt. Anschließend wurden die Objektträger in der feuchten Kammer bei 37° 4 Stunden (Kaninchen) oder 16 Stunden (Meerschweinchen) inkubiert. Vor und nach der Inkubation wurden die Leukocyten in der Zählkammer nach Neubauer ausgezählt.

Der Verlauf einer cutanen Nachimpfung beim Kaninchen als Kriterium einer abgelaufenen Immunreaktion wurde nach den von MAHNEL angegebenen Richtlinien beurteilt.

Erstimpfung: Am 4. Tag p.v. zeigt sich eine spezifische Rötung

am 5. Tag ein Papelstadium und sehr kurzes Bläschenstadium.

Am 6. - 7. Tag entwickeln sich Pusteln. Die größte Ausdehnung der Area besteht am 7. Tag. Am 8., 9. Tag trocknen die Pusteln ein. Schorfabfall beginnt nicht vor dem 20. Tag.

Immunitätsreaktion: Am 3. - 4. Tag schießen auf kaum infiltrierten Impfschnitten bis stecknadelkopfgroße Bläschen auf, die in wenigen Stunden eintrocknen. Die diskrete Area verschwindet am 5. - 6. Tag. Es bilden sich nur kleine Strichschorfe, die bereits ab 5. Tag abzufallen beginnen.

III) Durchführung und Ergebnisse der Versuche

1) Die Resorption des Vaccinia-Virus aus dem Verdauungs- trakt

wurde an Hand der rasch einsetzenden Resorptions-
viraemie nachgewiesen:

a) Vier Kaninchen (Nr. 1, 699, 660, 661) wurden in Nembutal-narkose laparatomiert und eine weiche, sterile Duodenalsonde mit abgerundetem Ende unter manueller Führung durch den Magen hindurch bis einige Zentimeter in den Dünndarm vorgeschoben. Durch den Schlauch wurde eine Vaccinia-Virussuspension (Volumen jeweils 1 ml; Titer: 4×10^7 VE/ml bzw. 4×10^6 VE/ml) instilliert. Anschließend wurde mit 10 ccm Leitungswasser gespült und die Sonde zurückgezogen. Nach 5, 10, 15, 30 Minuten wurde Blut durch Punktion von Mesenterialvenen gewonnen, nach 60 und 120 Minuten durch Punktion einer Ohrvene. Der Virusnachweis gelang in allen angegebenen Zeitabständen. (Siehe Tabelle 1)

b) Drei Meerschweinchen erhielten durch eine Magensonde 0,5 ml einer Vaccinia-Virussuspension (Titer 2×10^7 VE/ml) in den Magen instilliert. Nach Spülen und Zurückziehen der Sonde wurde nach 30, 60, 120 Minuten jeweils 1 Tier in Äthernarkose laparatomiert und Blut durch Punktion von Mesenterialvenen gewonnen. Hier gelang der Virusnachweis nach 30 und 60 Minuten. (Siehe Tabelle 1)

c) 10 Mäuse wurden mit einer Knopfkanüle intraoesophageal mit jeweils 0,5 ml einer Vaccinia-Virus-suspension von 10^7 VE/ml gefüttert. Nach 10, 15, 30, 60 und 120 Minuten wurde in Nembutalnarkose unter sterilen Cautelen bei je 2 Mäusen das Peritoneum eröffnet, Mesenterialvenen und Pfortader angeritzt und das Blut aus dem Abdomen mit einer Spritze aspiriert. Hier gelang der Virusnachweis in den Blutproben aller angegebenen Zeitabstände.

Bei allen diesen Versuchen wurde das Blut sofort nach Gewinnung eingefroren und vor dem Beimpfen der CAM mit gleichen Teilen physiologischer Kochsalzlösung verdünnt. Eine zahlenmäßige Relation der Plaques zu dem Zeitraum zwischen Virusapplikation und Blutabnahme ließ sich nicht feststellen. Auch war der Virusgehalt nie so groß, daß sich eine Konfluenz der Plaques ergab.

In Tabelle 1 sind die Ergebnisse der Versuche a - c zusammengefaßt.

Tabelle 1

Nachweis des Vaccinia-Virus im Blut bis zu 2 Stunden nach oraler Applikation:

Tier	Dosis (VE)	Virusnachweis nach						Min.
		5	10	15	30	60	120	
Kan.1	4×10^7	0	Ø	+	Ø	Ø	Ø	
699	4×10^7	0	Ø	+	+	(+)	(+)	
660	4×10^6	+	+	+	+	+	+	
661	4×10^6	(+)	0	(+)	+	+	+	
Maus	1×10^7	Ø	(+)	(+)	(+)	+	(+)	
GP	1×10^7	Ø	Ø	Ø	+	+	0	

+ bedeutet, daß der Virusnachweis in der 1. Eihautpassage gelang

(+) bedeutet, daß der Virusnachweis erst in der 2. Eihautpassage gelang

0 = Virusnachweis nicht geglückt

Ø = Virusnachweis nicht durchgeführt

Da bei diesen Versuchen mit Ausnahme von a) die Resorption des Virus im Verlauf des Verdauungstraktes nicht exakt lokalisiert werden kann, wurde zur Klärung dieser Frage noch folgende Versuchsanordnung aufgestellt.

d) 2 Kaninchen (Nr. 41 und 42) wurden in Nembutalnarkose gastrotomiert. Durch die Öffnung im Magen wurde eine Sonde 15 cm weit in den Dünndarm vorgeschoben und der Darm proximal des Sondenendes federnd abgekllemmt. Anschließend erfolgte durch die Sonde Instillation von 2 ml einer Vaccinia-Virussuspension (Trockenimpfstoff, Lösungsmittel: physiologische Kochsalzlösung, Titer: 1×10^8 VE/ml). Blutabnahme erfolgte nach 20 und 30 Minuten aus den Mesenterialvenen, nach 90 Minuten aus einer Ohrvene. Die Sonde blieb während dieser Zeit an Ort und Stelle!

Ergebnis des Virusnachweises:

	20	30	90	Min. nach Instillation
Nr. 41	(+)	0	0	
Nr. 42	+	0	+	

e) Bei Kaninchen Nr. 44 wurde in Narkose der Oesophagus in seinem cranialen Drittel von außen aufgesucht und ligiert. Danach wurden 10^8 VE (1 ml Trockenimpfstoff, gelöst in physiologischer Kochsalzlösung) mittels eines Watteträgers leicht in die Schleimhaut der Mundhöhle eingegeben. Bei bestehender Ligatur der Speiseröhre wurde nach 10, 20, 60 Minuten Blut aus einer Ohrvene abgenommen.

Ergebnis des Virusnachweises:

	10	20	60	Minuten nach Applikation
Kan. Nr. 44	+	+	o	

f) Kaninchen Nr. 43 wurde in Narkose laparotomiert. Knapp über der Cardia wurde der Oesophagus federnd abgeklemmt und eine Sonde in die Speiseröhre eingeführt. Danach wurde die Oesophagus im Halsteil freipräpariert und hier über der Sonde ligiert. Anschließend erfolgte Instillation von 2×10^8 VE (2 ml Trockenimpfstoff gelöst in physiologischer Kochsalzlösung). Blut aus einer Ohrvene wurde bei liegender Sonde nach 20, 30 und 75 Minuten abgenommen.

Ergebnis des Virusnachweises:

20	30	75	Minuten nach Instillation
+	o	+	

Faßt man die Befunde der Tierversuche von a - f zusammen, so ist folgendes festzustellen:

- 1) Die Resorption von Vaccinia Virus im Verdauungstrakt setzt nach oraler Applikation bereits nach wenigen Minuten ein.
- 2) Die Resorption selbst kann von der Schleimhaut des Maules, der Speiseröhre und des Darmes erfolgen.

2. Der Nachweis des Virus an der Resorptionsstelle
und im Blut 24 und mehr Stunden nach der Applikation

Der Virusnachweis wurde also in der Phase einer möglichen Virusvermehrung im Organismus ausgeführt. Zweck der Untersuchungen war, die Dauer der Infektionsvirämie und das Ausmaß einer eventuellen Virusvermehrung im Darm, d.h. am Orte der Resorption festzustellen.

a) 10 Mäuse wurden mit einer Knopfkanüle intraoesophageal mit jeweils 0,5 ml einer Vaccinia-Virussuspension von 2×10^7 VE/ml gefüttert. Vom 1. - 5. Tag p.v. wurden je 2 Tiere getötet und Dick- und Dünndarminhalt entnommen. Diese Proben wurden sofort mit physiologischer Kochsalzlösung 1 : 10 verdünnt und mit Penicillin und Streptomycin versetzt. Vor dem Beimpfen der CAM wurde das Material mehrmals eingefroren und wiederaufgetaut.

4 Meerschweinchen wurden mit je 0,5 ml einer Vaccinia-Virussuspension von 2×10^7 VE/ml per Magensonde gefüttert. Am 1., 2., 3. und 7. Tag p.v. wurde je 1 Tier getötet, Inhalt von Dick- und Dünndarm entnommen. Ferner wurden mehrere Partien der Dünn- und Dickdarmwand ausgeschnitten, gewaschen, eingefroren, vor der Verimpfung auf die CAM im Mörser verrieben und 1 : 5 in physiologischer Kochsalzlösung suspendiert. Tabelle 2 zeigt das Ergebnis der virologischen Untersuchung dieser Proben.

Tabelle 2

Nachweis des Vaccinia-Virus in Darminhalt und -wand
bis zu 7 Tage nach oraler Applikation:

	1	2	3	4	5	7	Tage p.v.
Darminhalt Maus	+	0	+	0	+	Ø	
Darminhalt Meerschweinchen	0	(+)	0	Ø	Ø	+	
Darmwand Meerschweinchen	+	0	(+)	Ø	Ø	(+)	

Zum Nachweis des Vaccinia-Virus in den Faeces schluckgeimpfter Tiere wurden folgende Versuche unternommen:

Je 2 Meerschweinchen und 1 Kaninchen wurden mit 3 ml einer Vaccinia-Virussuspension mit jeweils 4×10^4 , 4×10^6 , $1,2 \times 10^7$ VE per Magensonde gefüttert. 1 Kaninchen erhielt 5 ml einer Vaccinia-Virussuspension mit $2,0 \times 10^7$ VE.

Die Tiere wurden anschließend isoliert in desinfizierte Käfige gesetzt, die Faecesproben verarbeitet wie auf S.11 angegeben.

Tabelle 3 zeigt das Vorkommen des Vaccinia-Virus in den Faeces oral geimpfter Tiere über mehrere Tage nach der Impfung.

Tabelle 3

Nachweis des Vaccinia-Virus in den Paeces bis zu 18 Tagen nach oraler Applikation:

Tier	Dosis	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	17	18	Tage p.v.
Me	4×10^4	(+)	0	+	(+)	(+)	(+)	(+)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Me	4×10^7	+	+	+	+	(+)	(+)	(+)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Me	1×10^9	+	+	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
K	4×10^4	(+)	(+)	+	+	(+)	(+)	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
K	4×10^7	+	+	0	+	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
K	1×10^9	+	+	(+)	+	(+)	(+)	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
K	2×10^9	0	+	+	+	+	+	+	+	0	0	+	0	+	0	0	0	

Auch hierbei zeigte sich keine Abhängigkeit der Plaques-Zahlen von der Dosis und dem zeitlichen Abstand von der Impfung. Eine Konfluenz der Plaques ergab sich ebenfalls nie.

b) Bestimmung der Dauer der Infektionsvirämie

je Kaninchen (Nr. 677 und 679) erhielten per Magensonde je 5 ml einer Vaccinia-Virussuspension mit insgesamt 2×10^9 VE. In den angegebenen Zeitabständen erfolgte zwecks Virusnachweis Blutabnahme durch Punktion einer Ohrvene.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 zusammengefaßt.

Tabelle 4

Nachweis des Vaccinia-Virus im Blut bis zu 17 Tage nach oraler Applikation:

	1	2	3	5	6	7	8	9	12	13	15	17	Tage p.v.
677	+	0	0	0	+	0	0	+	+	0	0	0	
679	+	0	+	+	0	0	+	(+)	0	0	0	0	

Eine Abhängigkeit der Plaqueszahlen vom Abstand zur Schluckimpfung ließ sich hier ebenfalls nicht finden.

Faßt man die Ergebnisse von a und b zusammen, so ist festzustellen:

- 1) Nach einer Schluckimpfung mit Vaccinia-Virus besteht für einige Tage eine Infektionsvirämie.
- 2) Am Ort der Resorption, also im Verdauungstrakt läßt sich das Virus sporadisch über mehrere Tage p.v. nachweisen, und zwar in Darminhalt, Darmwand und Faeces. Jedoch scheint der Verdauungstrakt kein Ort der Virusvermehrung zu sein.

3. Die Stimulation der Immunogenese

a) durch aktives Virus

Als Kriterium einer Immunreaktion gilt in diesen Versuchen bei Mäusen, Kaninchen und Meerschweinchen das Auftreten haemagglutinationshemmender Antikörper nach der Impfung.

Zunächst erhielten 7 Kaninchen mittels einer Magensonde massive Virusdosen bis maximal 5 ml Vacciniavirussuspension mit insgesamt 2×10^9 VE instilliert. Vor der Impfung und 14 Tage danach wurden die HAH-Antikörper bestimmt. Das Ergebnis ist in Tabelle 5 zusammengefaßt.

Tabelle 5

Immunreaktion von Kaninchen auf die orale Infektion mit Vaccinia-Virus:

HAH-Titer

Dosis	Vor Vacc. 1:	14 Tage p.v. 1:
1×10^7	0	64
1×10^7	0	32
6×10^7	0	16
1×10^9	16	256
2×10^9	0	256
2×10^9	0	512
2×10^9	0	512

Bei allen Kaninchen waren 14 Tage nach der Schluckimpfung HAH-Antikörper nachweisbar.

Um eine Dosisabhängigkeit dieser Antikörperbildung feststellen zu können, wurde noch folgende Versuchsanordnung getroffen:

Je 3 Mäusen wurden Virusdosen von 10^2 - 10^8 VE (jeweils 0,5 ml Virussuspension) intraoesophageal verabreicht. Je 1 Kaninchen und 1 Meerschweinchen erhielten Dosen von 10^2 - 10^8 (bzw. 10^9) VE (jeweils 1 ml Virussuspension) durch orale Fütterung appliziert. 14 Tage später wurden bei allen Tieren die HAH-Antikörper bestimmt, nachdem vor der Impfung jeweils keine nachweisbar gewesen waren.

Das Ergebnis findet sich in Tabelle 6.

Tabelle 6

Immunreaktionen von Maus, Kaninchen und Meerschweinchen auf die orale Infektion mit Vaccinia-Virus in Abhängigkeit von der Infektionsdosis:

Dosis VE	Maus 1:	Kaninchen HAH-Titer 1:	Meerschweinchen 1:
10^2	8	0	0
10^3	8	16	0
10^4	16	512	0
10^5	128	256	0
10^6	8	512	0
10^7	128	256	0
10^8	256	256	128
10^9			32

Es tritt also beim Kaninchen bereits von einer Dosis ab 10^4 VE eine Steigerung des HAH-Titers ein. Bei der Maus liegt diese Schwelle bei 10^5 VE; Meerschweinchen bilden dagegen erst bei höheren Virusdosen HAH-Antikörper.

Zum Beweis einer erfolgreichen Immunisierung wurden die Kaninchen auf der enthaarten Rückenhaul durch 4 Impfschnitte cutan 3 - 4 Wochen nach der Schluckimpfung nachgeimpft. Diese cutane Nachimpfung ging bei mit hohen Dosen schluckgeimpften Tieren nicht an. Bei niederen Dosen bis zu 10^3 VE war eine deutliche Modifikation im Impfverlauf verglichen mit Erstimpfreaktionen zu erkennen. Es kam zu einer Immunitäts- bzw. unterdrückten Pustelreaktion (s. oben). Hierbei zeigen sich an den kaum infiltrierten Impfschnitten mit geringfügiger Area von 1 - 2 mm schon am 3. - 4. Tag kleine Bläschen, die in kurzer Zeit wieder eintrocknen. Der Abfall der Schorfe beginnt bereits am 5. Tag p.v. Die Ergebnisse sind in Tabelle 7 nochmals zusammengefaßt.

Tabelle 7

Antikörperbildung und Verlauf der cutanen Nachimpfung nach oraler Infektion mit Vaccinia-Virus in Abhängigkeit von der oralen Infektionsdosis:

Kan.Nr.	Dosis oralis (VE) in jeweils 0,5 ml Volumen	HAH-Titer bei Revacc. 1:	Impf- verlauf
3	1×10^2	0	E
2	1×10^3	16	I
694	1×10^4	128	I
680	1×10^5	256	I
698	1×10^6	512	I
690	1×10^7	256	I
661	6×10^7	16	I
1	1×10^8	256	Ø
679	2×10^9	128	Ø
697	2×10^9	256	Ø

Ø = Impfung nicht angegangen

I = Immunitätsreaktion

E = Erstimpfreaktion

b) Die Stimulation der Immunogenese durch inaktiviertes Virus

aa) Hitzeinaktiviertes Virus

Eine grobgereinigte Vaccinia-Dermovirussuspension vom Rind (Suspensionsmittel physiologische Kochsalzlösung) mit einem Ausgangstitr von 1×10^7 VE/ml wurde für 1 Stunde auf 65° C erhitzt. In diesem Material war auch bei 2 Eihautpassagen kein aktives Virus mehr nachweisbar. Von 5 verschiedenen Konzentrationen (unverdünnt; sowie 1:10, 1:100, 1:1000 und 1: 10 000 verdünnt) dieser inaktivierten Vaccinia-Virus-suspension wurde jeweils 1 ml an je 1 Kaninchen und 1 Meerschweinchen oral durch eine Knopfsonde appliziert. Da bei allen Tieren 3 Wochen p.v. keine Antikörper nachweisbar waren, erhielten die Tiere in zweitägigem Abstand nochmals jeweils 1 ml der unverdünnten Suspension dreimalig oral appliziert. HAH- Antikörper waren beim Meerschweinchen bis zu 4 Wochen nach der letzten Gabe nicht nachweisbar. Die Kaninchen wurden 14 Tage nach der letzten Fütterung - ohne daß HAH-Antikörper nachweisbar waren- auf der enthaarten Rückenhaut cutan nachinfiziert. Bei allen Kaninchen kam es danach zu einer typischen Immunitätsreaktion in der folgenden Form : am 3.-4. Tag p.v. bildeten sich auf den gering infiltrierten Impfschnitten kleine Bläschen, die bereits nach Stunden eintrockneten; die Area verschwand am 6.Tag p.v.; der Schorfabfall begann schon am 5.Tag p.v.

Zum weiteren Nachweis einer spezifischen Immunitätslage gegen das Vaccinia-Virus bei fehlenden Serum-Antikörpern wurde noch die Leukocytolysereaktion nach der Beschreibung von STICKL und ENGELHARDT angesetzt. Sie erfolgte am 9. Tag nach der letzten Auffrisch-Schluckimpfung mit hitzeinaktiviertem Vaccinia-Virus. Ihre Ergebnisse sind in Tabelle 8 zusammengefaßt.

Tabelle 8

Tier	orale Ausgangsdosis (+ dreimalige Boosterung)	Leukocytolyseindex
Ka,	10^3	77 %
"	10^4	69 %
"	10^5	92 %
"	10^6	63 %
"	10^7	63 %
"	Kontrolle	2 %
Me.	10^3	38 %
"	10^4	44 %
"	10^5	38 %
"	10^6	37 %
"	10^7	29 %
"	Kontrolle	0 %

Leukocytolyseindex = Prozente der gelösten Zellen im Areal
im Vergleich zu den intakten Zellen des
Kontrollansatzes.

Es zeigt sich hier, daß nach insgesamt viermaliger Gabe
von hitzeinaktiviertem Vacciniavirus bei Kaninchen eine
starke bis sehr starke, bei Meerschweinchen eine hin-
reichende Gewebeimmunität vorliegt.

bb) Vakzine - Antigen

4 Kaninchen erhielten je 1 ml handelsüblichen Vakzine- Antigens (Ausgangstitel vor der Inaktivierung 5×10^7 VE/ml) in 4 verschiedenen Konzentrationen (unverdünnt; 1:10, 1:100, 1: 1000 verdünnt) oral appliziert. Nach 5 Tagen bekamen sie die gleiche Menge in derselben Konzentration nochmals gefüttert. 9 Tage nach der letzten Gabe wurde bei den Tieren der Leukocytolysetest angesetzt. Er ergab bei allen Tieren eine hinreichende Leukocytolyse (Leukolyseindex 50 - 60 %).

12 Tage nach der letzten Gabe wurden die Tiere cutan mit virulentem Vaccinia-Virus nachgeimpft. Bei den beiden Kaninchen , die 1ml Vakzine-Antigen unverdünnt und in einer Verdünnung von 1:1000 je zweimal erhalten hatten, trat eine eindeutige Immunitätsreaktion auf, bei den anderen Tieren waren die Unterschiede gegenüber nicht vorbehandelten Impfkontrollen nicht eindeutig.

Zusammenfassend ergibt sich somit, daß nach mehrmaliger oraler Verabreichung von inaktiviertem Vaccinia-Virus bei Kaninchen und Meerschweinchen mit Hilfe der Leukocytolysereaktion, bei Kaninchen auch durch die cutane Nachimpfung eine gewebliche Immunität nachgewiesen werden kann.

4) Die Unschädlichkeit der oralen Immunisierung mit Vaccinia-Virus

wurde in folgenden, orientierenden Untersuchungen geprüft:

Kaninchen und Meerschweinchen erhielten je 1 ml einer Vaccinia-Virussuspension von 10^8 VE/ml oral appliziert. Bei beiden Tierarten trat zwischen dem 4. und 6. Tag p.v. eine Temperaturerhöhung um durchschnittlich $0,5^{\circ}$ C auf. Beim Meerschweinchen kam es zur stärksten Gewichtsabnahme von durchschnittlich 15% zwischen dem 4. und 8. Tag p.v., während sie beim Kaninchen am 21. Tag p.v. mit 6% am größten war. Auffällige Veränderungen der Leukocytenzahlen nach der Schluckimpfung wurden bei beiden Tierarten vom 1. bis 14. Tag p.v. nicht beobachtet.

Die folgenden Versuche galten der Frage, ob irgendwelche vaccinia-spezifischen Veränderungen an inneren Organen nach einer Schluckimpfung auftreten können.

28 Mäuse erhielten 0,1 ml einer Vaccinia-Virussuspension von 10^8 VE/ml durch eine Knopfsonde intraoesophageal gefüttert. Vom 1. bis 14. Tag p.v. wurden täglich 2 Mäuse getötet, der gesamte Magen-Darmtrakt herausgenommen, aufgeschnitten, gewaschen und unter Lupenvergrößerung inspiziert. Bei keinem Tier fanden sich pathologische Veränderungen an der Intestinalmucosa. Auch die inneren Organe, die Speiseröhre und der Rachenraum waren unauffällig. Daraufhin wurden noch 6 Meerschweinchen mit 2 ml einer Vaccinia-Virussuspension von 10^8 VE/ml mittels einer Sonde oral gefüttert. Jeden 2. Tag wurde ein Tier durch Aetherinhalation getötet und sezziert. Das Intestinum und die inneren Organe

einschließlich Trachea, Oesophagus und Rachenraum wurden einer sorgfältigen Inspektion mit Lupevergrößerung (8-fach) unterzogen. Außerdem wurden bei jedem Tier Gewebeproben aus Magen, Dünndarm, Ile-Coecalklappe, Dickdarm, Lunge, Leber, Lymphknoten und Milz entnommen, histologische Präparate angefertigt und nach Färbung mit Hämatoxylin-Eosin lichtmikroskopisch (Vergrößerung bis 400-fach) untersucht.

1 Tier starb am 6. Tag p.v. Die makro- und mikroskopische Untersuchung der Lunge ergab eine Aspirationspneumonie, die durch die unphysiologische Sondenfütterung zustande gekommen sein dürfte. Sonst war bei keinem Tier makro- oder mikroskopisch eine krankhafte Veränderung festzustellen.

Schließlich wurden noch 2 Meerschweinchen in Äthernarkose laparotomiert. Etwa 3 cm distal des Pylorus wurde der Dünndarm mit einer stumpfen Pinzette gefaßt und solange gequetscht, bis sich an dieser Stelle ausgedehnte subseröse Blutungen bildeten. Anschließend erhielten diese Tiere 2 ml einer Vaccinia-Virus-suspension (Titer 1×10^8 VE/ml) durch eine Sonde intragastral und die Bauchdecken wurden wieder verschlossen. Am 5. Tag postoperativ wurden die Tiere getötet und sezziert. Die Druckstellen am Dünndarm waren äußerlich an feinen petechialen Blutungen gerade noch erkennbar. Nach Aufschneiden des Darmes erwies sich die Schleimhaut an den fraglichen Stellen als völlig intakt.

Endlich wurde noch ein Kaninchen in Nembutalnarkose laparotomiert und der Dünndarm 6 cm distal des Pylorus in einer

Länge von 1 cm eröffnet. Gegenüber der Eröffnungsstelle wurde die Schleimhaut mittels eines Skalpells in einem Bereich von Kleinfingernagelgröße fast völlig abgeschabt. Oral und aboral davon und direkt am Ort der Läsion wurden 2×10^8 VE (2 ml Trockenimpfstoff, gelöst in physiologischer Kochsalzlösung) aufgebracht, anschließend Darm und Bauchdecken verschlossen, wobei noch auf die Serosanähte zusätzlich un- verdünnter Impfstoff aufgetropft wurde. Am 7. Tag p.o. wurde relaparatomiert. Die Eröffnungsstelle des Dünndarms war gut verheilt. Das fragliche Darmstück wurde reseziert. Die In- spektion desselben ergab, daß an der künstlich lädierten Schleimhaut inzwischen eine fast völlige restitutio ad integrum erfolgt war.

Nach diesen Versuchen kann als wahrscheinlich gelten, daß das Vaccinia-Virus nach einer Schluckimpfung keine spezifischen Veränderungen im Magen-Darmtrakt verursacht und sogar an pathologisch veränderten Abschnitten (z.B. Ulcera) des Magen- Darmtrakts keine vaccinalen Effekte erzeugt.

IV) Diskussion

Immunität kommt stets dann zustande, wenn ein Antigen (Immunogen) mit den Zellen des Immunsystems in Beziehung tritt. Das Immunsystem, das zwar funktionell als ein eigenständiges und hochspezialisiertes Organ angesehen werden kann, ist ubiquitär über den Körper verteilt.

Wählt man die Antigenapplikation so, daß eine hohe Immungendosis mit einer großen Zahl antikörperbildender Zellen zusammentreffen kann, sind die Voraussetzungen für eine gute immunogene Wirkung des Antigens gegeben.

Die Schnelligkeit der Immunisierung sowie das kongruente Auftreten der geweblichen und der humoralen Immunabwehr dürfte ausschlaggebend für Stärke und Dauer der Viraemie sein.

Bei der Variola ist der Verlauf der Erkrankung abhängig von der Eintrittspforte des Erregers im Körper. Nur bei aerogener Infektion kommt es zu "typischen" Pocken. Bei der nahen Verwandtschaft zwischen Vaccinia- und Variolavirus ist ebenfalls anzunehmen, daß ein Wechsel des Invasionortes den Ablauf der Impfreaktion beeinflusst. Bei der intestinalen Aufnahme des Vaccinia-Virus ist das ausgedehnte lymphatische System der Peyerschen Plaques, der abdominalen Lymphknoten, sowie der Glissonschen Dreiecke - also ein ausgedehntes und stark ausgebautes System immunkörperbildender Zellen - mit dem Impfvirus konfrontiert. Während eine Spreitung der Antigene durch ein Adjuvans

allein schon zu einer besseren Immunkörperantwort führt, darf umgekehrt sicherlich auch angenommen werden, daß ein ausgebreitetes und an Immunzellen reiches System ebenfalls zur besseren Antikörperbildung führt.

Demgegenüber kann bei der cutanen Pockenschutzimpfung nur eine relativ kleine Virusdosis (beim menschlichen Impfling etwa 2000 VE) von wenigen Zellen aufgenommen werden. Das Virus vermehrt sich zunächst an der Impfstelle. Erst nach einigen Tagen gelangt es in die Blutbahn und damit in die Organe. Die Viruskonzentration im Blut ist dabei sehr niedrig und liegt an der untersten Grenze der Nachweismöglichkeit.(WINKLER H.).

Im Gegensatz zur skarifizierten Haut bietet sich der Verdauungstrakt als natürlicher Applikationsort mit einer großen ,leicht penetralen Oberfläche und einer konzentrierten Präsenz von lymphatischen Organen an.

Seit den Untersuchungen von VERZAR , CUTHBERT und IVY steht fest, daß indifferente Partikel (Stärkekörner, Ruß) bis zu einer Größe von 0,1 mm im Durchmesser die unverletzte Darmwand passieren können.

Dieser Vorgang wird von VOLKHEIMER mit einer parazellulären Resorption (Persorption) erklärt. Bemerkenswert in diesem Zusammenhang ist, daß z.B. die Stärkekörner nach enteraler Verabreichung nur im Blut, nicht dagegen in den abführenden Lymphwegen des Darmes (ductus thoracicus) gefunden wurden. Neuere Untersuchungen von RAETTIG und HOFFMANN haben im Tierversuch gezeigt, daß apathogene Bakteriophagen nach Applikation in Speiseröhre, Magen, Darm oder Trachea bereits nach wenigen Minuten im peripheren Blut nachweisbar sind. RAETTIG bewies dasselbe auch für das Columbia-SK-Virus der Maus, von dem als pathogenem Enterovirus bisher angenommen wurde, daß es bei natürlichem Infektionsweg an die Uferzellen des Darmes adsorbiert werde. Untersuchungen über eine Resorption des Vaccinia-Virus nach oraler Applikation sind bisher aus der Literatur nicht bekannt. Nach den oben beschriebenen Versuchen ist jedoch auch für das Vaccinia-Virus eine schnelle und umfangreiche Resorption aus dem Verdauungstrakt anzunehmen, was aus 2 Gründen wünschenswert ist; denn

- 1) darf das Antigen nicht durch Magen- oder Darminhalt sowie durch Enzyme seiner immunogenen Funktion beraubt werden
 - 2) muß es in ausreichender Menge resorbiert werden.
- Beide Bedingungen scheinen bei der oralen Verabreichung von Vaccinia-Virus erfüllt zu werden.

Bei einer Resorptionszeit von 5 Minuten ist eine Schädigung des Virus durch proteolytische Fermente nicht anzunehmen, und in eigenen Versuchen konnte gezeigt werden, daß bereits 30 Minuten nach Sondenfütterung von 1 ml einer Vaccinia-Virussuspension von 10^8 VE/ml das Virus nur noch sporadisch im Dünndarminhalt von Meerschweinchen nachweisbar ist. Das Virus scheint nach der Resorption sich im ganzen Körper zu verteilen und im RES ein Vermehrungsstadium durchzumachen, was die lange Infektionsviraemie vom 1. - 12. Tage p.v. erklären könnte. Wiederholte virämische Schübe in der Phase der Virusmultiplikation treten nach HERRLICH auch bei der Variolainfektion auf. Jedenfalls konnte Vaccinia-Virus bei der Maus, gegeben in einer Dosis von 2×10^5 VE i.v., 2 Stunden nach der Infektion in allen inneren Organen nachgewiesen werden. Bei einem Meerschweinchen, das 2×10^9 VE oral erhalten hatte, fand sich Virus am 8. Tage p.v. in Lunge, Lymphknoten, Magenwand und Milz. Auch CASAGRANDE fand 10 Tage nach der Verfütterung von "Lymphpe" das Vaccinia-Virus in Milz und Niere. Möglicherweise wird von diesen "Infektionsherden" aus die Viraemie unterhalten. Das Vorhandensein des Virus vom 1. - 13. Tag p.v. im Darminhalt könnte dann durch einen Ausscheidungsvorgang von den Blutgefäßen in das Darmlumen erklärt werden. So konnte MIMS nach i.v. Injektion von Kuhpockenviren (10^7 pfu), diese mit Hilfe der Immunfluoreszenz in der Intestinalmukosa nachweisen. Auch die Funde von Vaccinia-Virus auf den Tonsillen von Erstimpflingen am 3. - 5. Tag p.v.

durch GINS, HACKENTHAL und KAMENTZEWA finden so vielleicht ihre Erklärung, wenn auch ihre Bestätigung bisher noch aussteht. KELLER und ENGLEY beobachteten bei der Maus nach intra-peritonealer Verabreichung von Bakteriophagen, daß diese regelmäßig in Urin und Faeces ausgeschieden wurden. Auch in eigenen Versuchen war nach i.v. Injektion von 2×10^5 VE bereits nach 35 Minuten das Vaccinia-Virus in der Darmwand und im Darminhalt der Maus nachweisbar.

Die Entstehung einer Immunität nach Verfütterung von Vaccinia-Virus konnte CASAGRANDE (1909) beim Hund beobachten, aber nur dann , wenn das Virus auch gleichzeitig in den inneren Organen nachweisbar war. Auch GASTINEL (zit. bei SOBERHEIM) fand nach Verfütterung von "Lymphe" mittels Sonde bei Kaninchen eine vaccinale Immunität. Dagegen beobachteten ANTOINE und WAGEMANS bei rein stomachaler Virusapplikation an Kaninchen keine Immunität, d.h. die cutane Nachimpfung verlief wie eine Erstimpfreaktion. Bei buccaler Applikation erzielten sie eine vaccinale Immunität, ohne daß an der Maul- oder Rachenschleimhaut Vaccinelasionen entstanden wären. Sie schlossen daraus, daß die Orte der Virusresorption Mundhöhle, Pharynx und Oesophagus seien.

WINKLER H.P. konnte nach direkter stomachaler Einverleibung großer Mengen von Influenzavirus bei Mäusen keine Antikörperbildung induzieren, obwohl er vermehrungsfähiges Virus in Milz und Lunge fand. Er folgerte daraus , daß man auf Wegen, auf welchen man nicht infizieren vermag, auch keine Immunisierung durchführen kann. Für das Vaccinia-Virus scheint dies nicht zuzutreffen.

Nach PASCHEN (zit. bei DOERR) spielt sich der natürliche Infektionsweg mit Variolavirus vermutlich sogar so ab, daß das eingeatmete Virus verschluckt wird und über die Lymphbahnen der Darmwand in das Blut gelangt. Eine Variolation wurde in Bengalen früher durch Verschlucken von Pockenschorfen ausgeführt.

In den eigenen Versuchen konnte eine Virusresorption nach buccaler oesophagealer, gastraler, intestinaler und als Nebenbefund auch nach rektaler Applikation gezeigt werden. Eine Antikörperbildung war auch nach Einverleibung des aktiven Virus distal der Cardia regelmäßig nachweisbar.

Das Fehlen nachweisbarer HAH-Antikörper nach Fütterung von inaktiviertem Virus überrascht nicht. So erzielten LIETZ und RAETTIG durch zehnmalige Gabe von inaktivierten *Dyspepsiecoli* eine gute Infektionsimmunität, aber keine Antikörperbildung. Möglicherweise wurde in den eigenen Versuchen das inaktive Antigen noch zu selten appliziert, so daß die Bedingungen eines Antigendauerreizes (HENNEBERG) noch nicht erfüllt waren. Vielleicht kommt es auch analog den Ergebnissen von RAUSS und KETYI überwiegend zur Bildung von Koproantikörpern.

Über lokale virusspezifische Veränderungen nach oraler Applikation ist bisher wenig bekannt. Daß bei bereits vorhandenen Laesionen der Schleimhaut im Mund und Rachenraum vaccinale Geschwürs- oder Pustelbildung auftreten,

ist sicher. Bei unverletzter Schleimhaut ist eine solche Reaktion wahrscheinlich sehr selten. ANTOINE und WAGEMANS fanden in Einzelfällen nach oraler Gabe von Vaccinia-Virus Pusteln an Zunge und Gaumensegel. In den eigenen Versuchen mit Fütterung von Flüssigimpfstoff wurden solche Veränderungen nie beobachtet. Lediglich bei ausgedehntem Auspinseln der gesamten Mundhöhle mit Impfstoff entstanden beim Kaninchen einzelne Pusteln an Zunge und Gaumen. Das Vorkommen vaccinia-spezifischer Veränderungen an der Schleimhaut des eigentlichen Magen-Darmtraktes nach einer Schluckimpfung ist nicht wahrscheinlich. HERRLICH beschreibt zwar, daß die Schleimhäute des Körpers bei der Variola major sich wie die Haut an der Krankheit beteiligen und Ulzerationen im Verdauungstrakt vorkommen. Auch EIMER (1853) berichtet über Pustelbildungen im Darmtrakt bei heftigen Blatternerkrankungen. Jedoch sind solche Erscheinungen beim Vaccinia-Virus nicht bewiesen. TEISSIER und DUVOIR (zit. bei PASCHEN) erzeugten beim Affen durch Verfütterung von Pockenimpfstoff Immunität und Ulzerationen im Magen. Jedoch scheint die Spezifität dieser Veränderungen nicht gesichert zu sein. CASAGRANDI berichtet in seinen umfangreichen Fütterungsexperimenten, daß er 12 und 19 Tage nach der Fütterung nur bei 2 Hunden kleine, erhabene, hyperämische Schleimhautbezirke im Darm beobachtet habe. Ulzerationen und Pusteln sah er nicht. ANTOINE und WAGEMANS fanden in ihren Versuchen den Magen-Darmtrakt stets unverändert. In den eigenen

Versuchen konnten trotz künstlicher Schleimhautläsionen und massiver Virusdosen vaccinia-spezifische Veränderungen am Magen-Darmtrakt oder an inneren Organen nicht erzeugt werden. Schleimhautverletzungen oder vaccinale Geschwürsbildungen brauchen also nicht die Voraussetzungen für eine erfolgreiche orale Immunisierung zu sein, wie HERRIICH annahm.

Die vorliegenden Versuchsergebnisse ermutigen dazu, auch für den Menschen eine geeignete orale Immunisierungsform gegen Pocken zu entwickeln. Die Bedeutung solcher Versuche für Massenimpfungen (Pockeneinbrüche, Militär) liegt offen zutage.

Ob die Wahl eines anderen Infektionsweges bei der Pockenimpfung zu weniger neuralen Impfschäden führt, kann jetzt noch nicht beurteilt werden. Es kann jedoch jetzt schon gesagt werden, daß, jedenfalls beim Tier, die Impfreaktionen nach Schluckimpfung leichter sind als bei cutaner Impfung. Damit ergibt sich der Vorteil der besseren Allgemeinverträglichkeit, das Fehlen von Impfnarben, und vermutlich ist auch der Provokationsreiz auf latente Erkrankungen und Vorschäden geringer. Weitere Untersuchungen hierzu sind bereits in Angriff genommen.

V. Zusammenfassung

- 1) Vaccinia-Virus gelangt nach oraler Gabe rasch in den Blutkreislauf.
- 2) Diese Resorptionsviraemie ist von einer länger dauernden Infektionsviraemie gefolgt.
- 3) Virusmengen über 10^5 VE führen bei Mäusen und Kaninchen mit Sicherheit zu einer serologisch nachweisbaren Immunreaktion, die sich beim Kaninchen auch durch die Modifikation der cutanen Nachimpfung manifestiert. Inaktiviertes Virus erzeugt keine Antikörper, jedoch läßt sich nach wiederholter Gabe von inaktiviertem Virus durch die Leukocytolysereaktion und die cutane Nachimpfung eine vaccinale Allergie bzw. eine gewebliche Immunität nachweisen.
- 4) Vaccinia-spezifische Veränderungen im Magen-Darmtrakt konnten bisher nach der Schluckimpfung mit Vaccinia-Virus nicht beobachtet werden.

VI. Literaturverzeichnis

1. ANTOINE,G.,et J.WAGEMANS : Essai de vaccination "Anti-Vaccinale" per os chez le lapin. C.r.Soc.Biol.96, 720 (1927)
2. - - et J.WAGEMANS : Essai de vaccination "Anti-Vaccinale" chez le lapin. Introduction du Vaccine par la voie gastro-intestinale. C.r.Soc.Biol.97, 921 (1927)
3. - - et J.WAGEMANS : Essai de vaccination "Anti-Vaccinale" chez le lapin. Importance de la mouqueuse buccale dans la vaccination per os. C.r.Soc.Biol.97, 923 (1927)
4. CASAGRANDE,O.: Su alcune quistioni relative all'immunità antivaccinale ottenuta col vaccinio filtrato attraverso le Berkefeld W. Annali d'Igiene Sperimentale 19, 306 (1909)
5. CHVOSTEK,F.: Zur Frage der Immunisierung per os. Wien. klin.Wschr. 14, 453 (1908)
6. CUTHBERT,P.S.,and A.C.IVY: Absorption of carbon particles from gastro-intestinal tract. Proc.Soc.exp.Biol.Med. 32, 1272 (1934)
7. DOERR,R.: Die Tropismen und spezifischen Lokalisationen der Virusarten. In : R.DOERR und C.HALLAUER: Handbuch der Virusforschung,2.Hälfte. Springer, Wien 1939. S.826
8. EHRLICH,P.: Experimentelle Untersuchungen über Immunität. I.Über Ricin. Dtsch.med.Wschr.32, 976 (1891)

9. EHRLICH, P.: Experimentelle Untersuchungen über Immunität.
II. Über Abrin. Dtsch.med.Wschr. 44, 1218 (1891)
10. - - : Historisches zur Frage der Immunisierung per os. Wien.klin.Wschr. 18, 652 (1908)
11. EIMER, C.H.: Die Blatternkrankheit in pathologischer und sanitätpolizeilicher Beziehung. Engelmann, Leipzig 1853
12. FICKER, M.: Über die Keimdichte der normalen Schleimhaut des Intestinaltraktes. Arch.Hyg. 52, 179 (1905)
13. GINS, H.A., H.HACKENTHAL, und N.KAMENTZEW: Experimentelle Untersuchungen über die Generalisierung des Vaccinia-Virus beim Menschen und Versuchstier. Z.Hyg. 110, 429 (1929)
14. HENNEBERG, G.: Antigendauerreiz. Münch.med.Wschr. 45, 2223 (1960)
15. HERRLICH, A.: Klinik der Impfpocken. In: HERRLICH A.: Handbuch der Schutzimpfungen. Springer, Berlin 1965
16. - - : Die Pocken. Thieme, Stuttgart 1967
17. HIRST, G.K.: The quantitative determination of influenza virus and antibodies by means of red cell agglutination. J.exp.Med. 75, 49 (1942)
18. HOFFMANN, M.: Tierversuche zur Schleimhautpassage und Resorptionsviraemie von T 3 - Phagen nach oraler, trachealer und rektaler Gabe. Zbl.Bakt.I Orig. 198, 371 (1965)

19. KELLER, R., and F. B. ENGLEY: Fate of bacteriophage particles introduced into mice by various routes. Proc. Soc. exp. Biol. Med. 98, 577 (1958)
20. KOPROWSKI, H., G. HERVIS, T. NORTON, and D. NELSON: Further studies on oral administration of living poliomyelitis virus to human subjects. Proc. Soc. exp. Biol. Med. 82, 277 (1953)
21. LIETZ, B., und H. RAETIG: Orale Immunisierung mit nicht vermehrungsfähigen Mikroorganismen oder ihren Antigenen. 5. Mitteilung: Tierversuche zur Schutzimpfung gegen Dyspepsiecoliinfektionen. Zbl. Bakt. I Orig. 204, 543 (1967)
22. MAHNEL, H.: Tierexperimentelle Untersuchungen mit Vakzine-Antigen. Arch. Virusforsch. 10, 529 (1960)
23. MAYR, A.: Experimentelle Arbeiten über das hämagglutinierende Prinzip bei den Tierpockenviren. Arch. Virusforsch. 6, 438 (1955)
24. MIMS, C. A.: The response of mice to the intravenous injection of cow-pox-virus. Brit. J. exp. Path. 49, 1 (1968)
25. PASCHEN, E.: Pocken. In: W. KOLLE, R. KRAUS, P. UHLENHUTH: Handbuch der pathogenen Mikroorganismen. Bd. VIII, 2. Urban und Schwarzenberg, Jena 1930, S. 821
26. RAETIG, H.: Tierexperimente zur Durchlässigkeit des Intestinaltraktes für Virus. Zbl. Bakt. I Orig. 191, 97 (1963)

27. RAETTIG, H.: Tierexperimente zur Resorptionsviraemie.
Zbl.Bakt.I Orig. 192, 534 (1964)
28. - - : Tierexperimente zur oralen Immunisierung mit
inaktiviertem Antigen. Zbl.Bakt.I Orig. 182, 525 (1961)
29. RAUSS, K., and I. KETI: Serum- and coproantibodies in mice,
immunized perorally with shigella flexneri. Zschr.f.
Imm.-forsch. 127, 37 (1964)
30. SALK, J.E.: A simplified procedure for titrating haem-
agglutinating capacity of influenza virus and the
corresponding antibody. J.Immunol. 49, 87 (1944)
31. SOBERNHEIM, G.: Immunitätsverhältnisse bei Menschen- und
Tierpocken. In: O.LENTZ und H.GINS: Handbuch der Pockenbe-
kämpfung und Impfung. Schoetz, Berlin 1927, S.811
32. STICKL, H., und J.ENGELHARDT: Die Leukocytolyse als Zeichen
der spezifischen Reaktionsfähigkeit der Gewebe auf Vaccine-
virus nach der Pockenschutzimpfung. Z.Hyg. 151, 111 (1965)
33. VERZAR, F.: Aufsaugung und Ausscheidung von Stärkekörnern.
Biochem.Zschr. 34, 86 (1911)
34. VOLKHEIMER, G.: Das Phänomen der Persorption von Stärke-
körnern. Die Stärke. 4, 117 (1968)
35. WINKLER, H.: Zum Nachweis des Vakzinevirus im Blut kutan ge-
impfter Kaninchen. Zschr.Imm.und Allergieforsch.129,97 (1965)
36. WINKLER, H.P.: Versuche über orale Immunisierung. Med.Diss.
Berlin 1962

Lebenslauf:

Am 28. August 1940 wurde ich als Sohn des Diplom-
ingenieurs Dr. Joseph Huber und seiner Ehefrau Sophie,
geb. Karl, in München geboren. Die Volksschule besuchte
ich von 1946 bis 1950 in München, anschließend trat ich
in die humanistische Abteilung des Wittelsbacher
Gymnasiums in München ein. Hier legte ich 1959 die
Reifeprüfung ab. 1959 begann ich mit dem Studium der
Medizin an der Universität München, wo ich es nach 11
Semestern 1965 mit der ärztlichen Prüfung beendete.
Nach Erhalt der Approbation im Oktober 1967 arbeitete
ich als Assistenzarzt an der chirurgischen Abteilung des
Rot-Kreuz II Krankenhauses in München. Seit April 1968
bin ich als wissenschaftlicher Angestellter an der
Bayerischen Landesimpfanstalt in München beschäftigt.

